

浸潤性乳管癌におけるHIF-1 誘導遺伝子としての Hexokinase II の発現意義

著者	佐藤 章子
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第15425号
URL	http://hdl.handle.net/10097/58399

博士論文

浸潤性乳管癌における HIF-1 α 誘導遺伝子としての
Hexokinase II の発現意義

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻

外科病態学講座腫瘍外科学分野

佐藤 章子

目次

I. 要約	p.1~3
II. 研究背景	p.4~6
III. 研究目的	p.6
IV. 研究方法	p.7~11
V. 研究結果	p.12~15
VI. 考察	p.16~21
VII. 結論	p.22
VIII. 謝辞	p.23
IX. 参考文献	p.24~31
X. 図の説明	p.32~34
XI. 図	p.35~41
XII. 表	p.42~50

I. 要約

【研究背景・目的】 癌組織における低酸素状態は薬剤抵抗性、放射線抵抗性に関与していることが広く知られている。癌組織で低酸素暴露により増加する Hypoxia-inducible factor 1 α (低酸素誘導因子: HIF1- α) は予後不良と関連があるとの報告が多く、60 以上の遺伝子を直接誘導する転写因子として機能するタンパク質である。誘導される遺伝子の機能は、血管新生、細胞増殖、解糖系亢進、薬剤抵抗性など多岐に渡っている。しかし、HIF-1 α の癌の悪性度を決定している作用機序の詳細は未だ不明である。乳癌の予後やその性質を決定しているのはそれら誘導遺伝子の発現パターンによるものが大きく、誘導遺伝子の中で最も再発に影響を与えている遺伝子が解明できれば乳癌における治療戦略の一助となり、さらには新たな標的治療のターゲットを解明できると考えられる。本研究では、初めて HIF-1 α 誘導遺伝子群をマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルデータを用いて網羅的に解析した。更に再発群で発現量が多かった遺伝子を免疫組織化学的に解析し、その発現意義を解明することを目的とした。

【対象と方法】 2001～2002 年に東北大学病院で手術を行った浸潤性乳管癌 10 例のマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析データを用いて、*HIF-1A* (HIF-1 α の遺伝子) と 64 の HIF-1 α 誘導遺伝子を再発、無再発群に分けて遺伝子発現量を解析した。次に 2004～2008 年に東北大学病院で手術した浸潤性乳管癌 118 例の切除標本を

対象として臨床病理学的およびマイクロアレイのデータ解析にて再発群で発現比が高かった4種類:Hexokinase II(HKII, 遺伝子: *HK2*)、HIF-1 α (遺伝子: *HIF-1A*)、vascular endothelial growth factor (VEGF, 遺伝子: *VEGFA*)、 multidrug resistance protein- 1 (MDR-1, 遺伝子: *ABCB1*) を含めて免疫組織化学的に解析を行った。

【結果】 マイクロアレイのデータ解析より HIF-1 α 誘導遺伝子の中で最も再発に関与するのは *HK2* であることが判明した。*HK2* は無再発群に対して再発群で 1.9 倍の発現比であった。*HKII* 発現は免疫組織化学染色により、乳癌の 44%で陽性となり HIF-1 α 発現 と正の相関関係にあった。また、細胞増殖能マーカーである Ki-67 標識率 (Ki-67 labeling index: Ki-67 LI) や古くから乳癌の悪性度判定に用いられている核グレード、組織学的グレードとも正の相関関係にあった。乳癌症例における *HKII* 高発現は、無病生存率 (disease-free survival rate: DFS)、全生存率 (overall survival rate: OS) とともに有意に予後規定因子であったが、術後補助療法として内分泌療法、化学療法を加えた群においても予後不良の傾向がみられた。多変量解析において、*HKII* は Ki-67 LI と並び独立した再発予測因子となった。また、これはホルモン受容体陽性乳癌 (93 症例) でも同様の結果となった。

【考察】 *HKII* は解糖系の第一段階を触媒する律速酵素である。多くの癌細胞ではミトコンドリアでの酸素呼吸を抑制させて解糖系を顕著に亢進させており、これは Warburg 効果と呼ばれる癌細胞の特徴の一つである。*HKII* は胃癌、肝癌では予後不良因子として報告があるが、乳癌では報告がなく本研究で初めて検討した。免疫組織化

学的に解析したところ、乳癌の 44%に発現し、高い増殖能、悪性度と相関し、独立した再発予測因子となることが判明した。ホルモン受容体陽性乳癌でも再発予測因子となることから、術後補助療法決定の際の指標の一助となる可能性がある。また、HIF-1 α の予後不良性に HKII 発現が密接に関与しており、その阻害は新たな治療標的になる可能性があると考えられる。

【結論】乳癌のマイクロアレイのデータ解析により HIF-1 α 誘導遺伝子群の中で HK2 が最も再発に関与していることが判明した。免疫組織化学的解析により HKII 発現は高い増殖能、悪性度に関与し独立した再発予測因子となることが解明され、治療戦略の一助となる可能性が示された。

II. 研究背景

近年、日本における女性の乳癌粗死亡率は肺癌、胃癌、結腸癌、膵癌に次いで5番目に高頻度で、罹患率は依然として増加傾向をたどっている。現在乳癌の初期治療ではマイクロアレイで分類される *intrinsic subtype* を基盤に、日常診療では免疫組織化学染色を用いて代替した4つのサブタイプ分類が初期薬物療法選択のよりどころとなっている。St.Gallen コンセンサス会議で推奨される適応に応じてサブタイプ毎に内分泌療法、化学療法が施行されるが¹⁾、早期に再発する症例も少なくない。術後内分泌療法単独で治療した患者の10年での再発率は10%²⁾、2012年の報告では術後化学療法の11の臨床試験の結果25%が再発しており、再発までの期間は20カ月（中央値）であった³⁾。乳癌における再発に関与する分子メカニズムの詳細は未だ不明で、これを解明することは患者の予後を改善する手立てになると考えられる。

癌組織における低酸素状態は薬剤抵抗性、放射線抵抗性に関与していることは広く知られており⁴⁾、更に予後不良と関連があるとの報告が多い⁵⁾ ⁶⁾。低酸素に陥った癌組織では低酸素誘導因子（hypoxia-inducible factor 1 α : HIF-1 α ）が細胞質に急速に蓄積し、核内に移行し転写因子として働く（図1）。正常酸素分圧下ではプロテアソームにより分解されて、ほとんど検出できない。しかし一旦低酸素に暴露されると、HIF-1 α の転写活性領域のC末端側に位置するアスパラギン残基が水酸化を抑制するため、ユビキチン化による分解が抑制されて、安定化するため急激にHIF-1 α が蓄積

する。蓄積した HIF-1 α はヒストン脱アセチル化酵素の結合により、核内に移行し β サブユニットと 2 量体を形成し応答遺伝子 HREs (hypoxia responsive elements) に結合することによってさまざまな増殖因子の転写を誘導する⁷⁾。HIF-1 α によって直接発現が誘導される遺伝子は現在までに 60 以上が報告されており⁸⁾ (図 2)、これらの遺伝子はプロモーターエンハンサー領域に HIF-1 結合配 (HREs) を有する。HIF-1 α が誘導する遺伝子は、血管新生、赤血球産生、アポトーシス制御、細胞増殖、解糖系亢進、pH 調節、薬剤抵抗など多岐にわたり機能を調節している。しかし、HIF-1 α が癌の悪性度を決定している作用機序の詳細は未だ不明である。現在まで、多くの HIF-1 分子標的薬剤が開発され臨床応用されており、HIF-1 の直接阻害剤として PX-478、Echinomycin、103D5R、Chetomin などがある⁹⁾。このうち Echinomycin は HIF-1 の HRE 配列への結合を阻害するが¹⁰⁾、第 II 相試験において進行乳癌に対しては無効であった¹¹⁾。現在までに HIF-1 の直接的阻害剤の中で医薬品として上市されたものはない。

このように HIF-1 自体には既に多くの研究があり、今後は HIF-1 の上流または下流の分子標的薬の開発が急がれる。近年、上流の因子としては mTOR (mammalian target of rapamycin) を標的としたエベロリムスが内分泌療法抵抗性乳癌において内分泌療法と併用した第 III 相試験 (BOLERO-2) において有意に progression free survival (PFS) を延長したことが報告されている¹²⁾。下流の因子を標的とした薬剤としては VEGF を標的としたベバシズマブがあり、日本では 2011 年に転移再発乳癌の適応が認可された。このような中、低酸素に導かれる癌組織の悪性度を決定しているのは HIF-1 α

そのものの発現はもとより、その下流に位置する誘導遺伝子群の発現パターンによって強く特徴づけられる可能性が考えられる。

Ⅲ. 研究目的

多彩な機能発現を調整している HIF-1 α 誘導遺伝子の中で最も再発に影響を与えている遺伝子が解明されれば乳癌における治療戦略の一助となり、更には新たな標的治療のターゲットを解明できると考え、本研究では、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現プロファイルデータを用いて HIF-1 α 誘導遺伝子群の中で最も再発に関与する遺伝子を解明し、さらには免疫組織化学的解析を施行することにより、その遺伝子を同定し発現意義を解明することを目的とした。

IV. 研究方法

1. 対象症例

本研究では、1)、2)を対象とした。

1) 2001～2002年に東北大学病院で手術施行された浸潤性乳管癌 10 例 (表 1A)。

年齢は 48-74 歳 (中央値 55 歳)、全例がホルモン受容体陽性で術後補助療法として内分泌療法施行、4 例は化学療法も施行された。ホルモン受容体陽性はエストロゲン受容体 (estrogen reseptor: ER) 陽性かつ／またはプロゲステロン受容体 (progesterone receptor: PgR) 陽性とした。ホルモン受容体陽性の定義は Allred score が 3 以上とし¹³⁾、ER は全例が score 6 以上、PgR は全例が score 4 以上であった。術後観察期間は 15-82 カ月 (中央値 70 カ月) で、半数の 5 例が再発した。

2) 2004～2008年に東北大学病院で手術を施行された浸潤性乳管癌の 118 例 (表 1 B)。年齢は 27-87 歳 (中央値 57 歳)、93 例 (79%) がホルモン受容体陽性で 91 例 (77%) が術後補助療法として内分泌療法施行、54 例 (46 %) に化学療法が施行された。術後から初発再発までの期間を無病再発期間、術後から死亡日または最終外来受診日までを全生存期間とした。平均観察期間は 3-84 カ月 (中央値 57 カ月) であった。

2. マイクロアレイデータによる HIF-1 α 誘導遺伝子群の網羅的発現解析

対象 1) の浸潤性乳管癌 10 例の凍結切片を用いて東北大学病理診断学分野で施行

されたマイクロアレイにより 44792 の遺伝子の発現を網羅的に解析したデータを用いた。64 の HIF-1 α 誘導遺伝子と *HIF-1A* (遺伝子名) の遺伝子の発現量を解析した。

解析の際は、再発群 (5 例) と無再発群 (5 例)、および Ki-67 LI は中央値から高値群 (23-44%) 5 例と中央値から 低値群 (7-22%) 5 例の 2 群に分けて検討した。

マイクロアレイについては、凍結標本を Tissue-Tek optimal cutting と temperature compound (Sakura Finetechnical Co., Tokyo, Japan) 包埋し、クリオスタットミクロトーム (MICROM® GmbH HM550VP:ZEISS, Oberkochen, Germany) で 8 μ m の切片を作製しトルイジンブルー染色を施行。MMI Cellcut システム (Molecular Machines and Industries) を用いてレーザーキャプチャーマイクロダイゼクション (LCM: Laser capture microdissection) を行い、癌細胞のみを採取し、RNeasy® Micro Kit (QIAGEN) により総 RNA 量が 200ng となるように RNA を抽出した。マイクロアレイには Affymetrix 社のマイクロアレイスライド (complete human U133 GeneChip set) を用いて 22215(U133A)、22577 (U133B)の遺伝子についてプロトコールに従って施行した^{14) 15)}。

3. 免疫化学染色の方法

対象 2) において、免疫組織化学染色を行った。癌の最深部を含む部位の組織検体を 10%ホルマリンにて固定し、パラフィン包埋ブロックを作成した。これを厚さ 4 μ m に薄切し、これらの標本について Hematoxylin & Eosin 染色を行った。更にマイクロアレイのデータ解析にて再発群で発現量が多かった 4 種類: HexokinaseII (HKII, 遺伝子:

HK2)、HIF-1 α (遺伝子: *HIF-1A*)、vascular endothelial growth factor (VEGF, 遺伝子: *VEGFA*)、 multidrug resistance protein 1 (MDR-1, 遺伝子: *ABCB1*) と微小血管密度 (microvessel density: MVD) 計測のため CD31 をストレプトアビジン・ビオチン法を用いて免疫組織化学染色を行った。

免疫組織化学染色での 1 次抗体の希釈倍率と抗原賦活条件を表 2 に示す。組織切片を脱パラフィン後、3.0%過酸化水素を含むメタノールに 10 分室温でインキュベートし、内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止した。抗原賦活処理を行った後、phosphate-buffered saline (PBS) で 5 分間 3 回の洗浄を行い、マウスモノクローナル抗体に関しては正常ウサギ血清、ウサギモノクローナル抗体に関しては正常ヤギ血清を用いて 30 分室温でブロッキングし、非特異的抗体阻止を行った。その後 1 次抗体を加えて 4℃で一晩反応させた。翌日 PBS で 5 分間 3 回洗浄を行い、マウスモノクローナル抗体に関してはビオチン標識抗マウス抗体、ウサギモノクローナル抗体に関してはビオチン標識抗ウサギ抗体 (いずれも Nichirei Biosciences Inc., Japan) を 2 次抗体として加えて 30 分室温で反応させた。続けて同様の PBS 洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (Nichirei Biosciences Inc.) に 30 分室温でインキュベートした。さらに同様の PBS 洗浄後、3,3'-diaminobenzidine (DAB) solution (0.001M DAB、0.05M Tris-HCl Buffer, pH7.6、0.006% hydrogen peroxidase) で発色し、ヘマトキシリンによる核染、エタノール脱水処理、キシレン透徹、封入を行った。

尚、ER は抗体 SP1 (Roche Diagnostics Japan) を PgR は抗体 1E2 (Roche Diagnostics

Japan)を使用した自動免染装置(Ventana Benchmark XT)により染色し、HER2はHercep Test kit (Dako) を使用して染色した。

4. 組織学的評価

組織学的評価は the Union for International Cancer Control の TNM classification of malignant tumours 第6版に基づいて行った。免疫組織化学染色の評価について、HKII に関しては、正常細胞より同等以上に強く染色されるものを陽性とし、細胞質陽性率が10%以上を陽性とした^{16) 17)}。ER、PgRはAllred scoreを用い、3以上を陽性とした¹³⁾。HER2は、Hercep test II (Dako)の判定方法に則り、細胞膜陽性率が強度陽性10%以上をスコア3+とし陽性にした。中程度陽性はスコア2+としさらにFISH法により再検査を行い、遺伝子数/セントロメア比が2.2以上を陽性とした¹⁸⁾。Ki-67はhotspotにおける腫瘍細胞1000個における核陽性細胞数を計測し、LI (labeling index:%)を算出した^{19) 20)}。VEGF、MDR-1はimmunoreactive score (IRS)を用いて細胞質の染色強度を評価した^{21) 22)}。IRSは、染色濃度スコア(0:染色なし、1:弱、2:中等度、3:強度)と染色領域(0:なし、1:<10%、2:10%~50%、3:51%~80%、4:>80%)とを掛け合わせた1~12で得られるスコアであり、 $IRS \geq 4$ を陽性とした^{21) 22)}。HIF-1 α は、核及び細胞質で陽性²³⁾となり既報²⁴⁾を修正してVEGFやMDR-1と同様にIRSで評価した。MVDの評価は弱拡大で染色された血管密度がもっとも多い領域に関して、200倍検鏡で微小血管をカウントし算出した²⁵⁾。ER、PgR、HER2(human epidermal growth

factor recapror-2)の評価は病理報告書より抽出した。118 例中、ER 陽性は 93 例(79%)、PgR 陽性は 81 例 (67%)、HER2 陽性は 17 例 (15%)、何れも陰性 (トリプルネガティブ) は 16 例 (13%) であった。

5. 統計解析

統計解析は JMP Pro Version 9.0.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて行った。2 群間の比較は、Pearson の χ^2 検定、Kruskal Wallis 検定 を適時使い、3 群間の比較は Kruskal Wallis 検定を用いた。累積生存率は Kaplan-Meier 法により算出し、log-rank 検定を用いた。また、単変量、多変量解析は Cox 比例ハザードモデルを用いた。無病生存期間は手術日から初発再発診断日まで、生存期間は手術日から死亡または最終外来受診日までとして算出した。以上の解析は *P* 値が 0.05 未満を統計学的有意とし太字記載し、*P* 値が 0.05 以上、0.1 未満は境界領域の有意差として斜字体で記載した。

6. 倫理面への配慮と利益相反の有無

本研究にあたっては、ヘルシンキ宣言—ヒトを対象とする医学研究の倫理的原則を遵守し、全症例において術前に文書で患者の同意を得ている。また、全ての検体の使用・研究に関しては、東北大学医学系研究科倫理委員会の承認を得ている(受付番号: 2011-596)。本研究について開示すべき利益相反事項はない。

V. 研究結果

1. マイクロアレイデータ解析による HIF-1 α 誘導遺伝子群の遺伝子発現プロファイリング結果

1) HIF-1 α 誘導遺伝子発現と再発の関係

10 例を再発群 (5 例)、無再発群 (5 例) に分け、それぞれの遺伝子発現量の平均値を算出しその比を発現比としてプロットした散布図を作成した (図 3 A)。発現比が 1.5 以上を再発グループで優勢、0.5 以下を無再発グループで優勢と仮定した²⁶⁾。再発群で発現が優勢であるのは、6 遺伝子 (9 %)、無再発群で発現が優勢であるのは 3 遺伝子 (5 %) であった。56 遺伝子 (86 %) は発現比 1.5~0.5 の間に含まれ、再発、無再発群では同様の遺伝子発現であった。再発群で優勢な遺伝子の中で最も高い 1.9 倍の発現比を示したのは *HK2* であった (表 3)。

2) HIF-1 α 誘導遺伝子発現と Ki-67 LI の関係

Ki-67 LI を中央値より高値群 (23-44%)、Ki-67 LI 中央値より低値群 (7-22%) に分け、遺伝子の発現量の比を上記同様に算出した (図 3B)。12 遺伝子 (18 %) が Ki-67 LI 高値群で発現が優勢であった。

1)、2) より再発群においても、Ki-67 LI 高値群においても発現が優勢な遺伝子は 4 遺伝子 : *HK2*、*ADRA1B*、*GPI*、*ADM* であった (表 3)。

2. 乳癌組織標本 118 例における HKII の免疫組織化学的結果

免疫組織化学染色による発現状況は図 4 に示す。すべて 200 倍で、スケールバーは 50 μm である。

1) HKII と臨床病理学的因子の関係

HKII は 52 例 (44%) が陽性、66 例 (56 %) が陰性であった。HKII と臨床病理学的因子との相関関係を表 4 に示す。

年齢、閉経状況、ステージ、腫瘍径 (pT)、リンパ節転移 (pN)、核グレード、組織学的グレード、ER、PgR、HER2、Ki-67 LI、HIF-1 α 、VEGF、MDR-1、MVD についての関係を検討したところ、核グレード ($P = 0.0099$)、組織学的グレード ($P = 0.038$)、Ki-67 LI ($P = 0.0084$)、HIF-1 α ($P = 0.034$) で有意に正の相関がみられた。

HIF-1 α 関連遺伝子の相関関係を表 4 に示す。HKII は HIF-1 α と正の相関関係にあった ($P = 0.034$)。その他の因子との相関はなかった。HIF-1 α は VEGF ($P = 0.019$) と、VEGF は MVD ($P = 0.0002$) とそれぞれ正の相関関係にあった。MDR-1 は何れの因子とも相関関係はなかった。

2) HKII 発現と予後の関係

HKII の発現は log-rank 検定において全生存率 (overall survival rate: OS) ($P = 0.046$)、無病生存率 (disease-free survival rate: DFS) ($P = 0.027$) とともに有意な予後規定因子となった。(図 5AB)

また、術後内分泌療法施行した症例（91 例）においても log-rank 検定において DFS では有意差があった（ $P = 0.046$ ）（図 5C）。OS においては傾向がみられたが、有意差はなかった（ $P = 0.082$ ）（図 5D）。術後化学療法施行症例（54 例）では DFS（図 5E）、OS ともに有意差がなかったが、OS においては傾向がみられた（ $P = 0.079$ ）（図 5F）。

3) HKII 発現、その他の臨床病理学的因子と予後との関係

単変量解析では DFS において、Ki-67 LI、pT、pN、組織学的グレード、MVD、HKII、が有意に予後規定因子となり、これらの有意差があった因子で多変量解析すると、Ki-67 LI、HKII の二つが独立した予後規定因子となった（表 6A）。OS においては単変量解析で、Ki-67 LI、pT、pN、組織学的グレード、HKII、MVD が有意に予後規定因子となったが、それらを多変量解析すると何れも独立した予後規定因子とはならなかった（表 6B）

4) ホルモン受容体陽性症例での HKII 発現、その他の臨床病理学的因子と予後との関係

ホルモン受容体陽性症例 93 例を抽出し、同様に検討を行った。

単変量解析では DFS において、Ki-67 LI、組織学的グレード、pT、MVD、pN、HKII が有意に予後規定因子となった。有意差があった因子で多変量解析すると、Ki-67 LI、HKII の二つが独立した予後規定因子となった（表 7A）。OS においては単変量解析で、

組織学的グレード、MDR-1、MVD、pN が有意に予後規定因子となったが、それらを多変量解析すると何れも独立した予後規定因子とはならなかった（表 7B）。

VI. 考察

本研究は、乳癌細胞のマイクロアレイにより 4 万以上の遺伝子発現を網羅的に解析したデータを用いて、HIF-1 α 誘導遺伝子群 (64 遺伝子) の再発に関与する遺伝子発現量を解析した初めての報告である。同様に再発に関与する遺伝子を網羅的に解析した報告は存在するが²⁷⁻²⁹⁾、それぞれの報告で選択した遺伝子群は多岐にわたり、生物学的特徴までは言及されていない。本研究で再発に関与する可能性が高い遺伝子として同定されたのは *HIF-1A* 以外に *HK2*、*ADRA1B*、*DEC1*、*GPI*、*ADM* の 5 遺伝子であるが、このうち α 1b-AR (遺伝子名: *ADRA1B*) はアンドロゲン受容体の一種で再発や予後不良因子として報告があり³⁰⁾、Phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor (遺伝子名: *GPI*) は epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) を誘導し、やはり乳癌の増殖や予後不良因子と相関がある³¹⁾。*DEC1*^{32, 33)} や *ADM*³⁴⁾ も乳癌において報告がある。本研究では最も再発と関連がある遺伝子として *HK2* が同定されたが、HKII の臨床病理組織学的因子との相関や予後因子としての報告が存在せず、本研究が初めての報告である。

HKII とはグルコースをグルコース-6-リン酸に分解する酵素で、解糖系の第一段階を触媒する律速酵素として働く (図 7)³⁵⁾。哺乳類では HKI~HKIV の 4 種類のアイソザイムが存在するが^{33, 36)}、発現解析の結果、悪性度の高い腫瘍細胞に高発現しているのは 2 型アイソザイム (HKII) であることが明らかになっている³⁷⁾。腫瘍細胞が正

常細胞より高い糖代謝活性を示すことは古くから知られており、それを臨床応用したのがポジトロン断層撮影法（PET）であり³⁸⁾、糖の利用が活発な組織に 18 FDG（18-フルオデオキシグルコース）が選択的に取り込まれることを利用したイメージング技術である。

免疫組織化学染色により、乳癌の HKII の陽性率は 44%であった。HKII は良性腫瘍や正常組織よりも悪性腫瘍で活性が高いことが報告されており³⁹⁾、胃癌においては 17-21%が陽性^{16) 40)}、肝癌においては 45-56%が陽性と報告がある^{17) 41)}。乳癌における免疫組織化学染色は過去に一報のみあり、Brown et al. が 79%で陽性であったと報告している³⁸⁾。HKII の正常組織内での免疫染色による陽性率について明記した報告は調べうる限りない。今回の免疫染色では HKII は乳癌の癌細胞で陽性となり、正常乳腺組織では弱陽性から陰性であった（図 4）正常部における HKII の染色性を癌細胞と同様の基準で評価すると全例が陰性となった。以上より癌組織における比較的高い陽性率を考慮すると乳癌組織においてもその発現が重要な因子として考えられる。

本研究において、HKII の発現と、Ki-67 LI が有意に正の相関関係にあった。Ki-67 は細胞周期核関連タンパクであり、細胞周期 G0 期を除くすべての細胞周期（G1, G2M, S 期）を認識できるため増殖能を反映するマーカーとして知られる⁴²⁾。現在では初期薬物療法を決定する指標になり予後予測因子としてや化学療法の効果予測因子として重要視されている。また、多くの癌細胞はミトコンドリアでの呼吸を抑制して酸素消費を抑えると同時に解糖系を顕著に亢進させて解糖系からエネルギー（ATP）を産

生し、さらには細胞増殖に必要な生体高分子（ヌクレオチド、アミノ酸、脂肪酸）を大量に作り出している^{43,44)}。これは Warburg 効果とよばれ、癌細胞の特徴の一つである。つまり活発に増殖している癌細胞ではグルコースを高率に解糖しており、その分解酵素である HKII が高発現していると考えられる。これより HKII による解糖系亢進は細胞増殖において不可欠であると考えられ、HKII 発現と、Ki-67 LI が関連することを裏付けている。

HIF-1 α 発現と HKII 発現は有意に正の相関を示した。癌組織の低酸素下では転写因子である HIF-1 α が急速に増加し HKII の発現を誘導する⁴⁵⁾。HIF-1 α と HKII の相関関係は免疫組織化学的には肝癌⁴⁶⁾ や胃癌⁴⁰⁾ にて報告されている。HKII の発現は主に HIF-1 α に誘導されていることは上述の通りである。しかし一方で、HKII 陽性群 56 例の中で 19 例が HIF-1 α が陰性であった。これは HIF-1 α 以外の因子にて発現を調整されている可能性を示唆している。文献的には *in vitro* の報告であるが、前立腺癌細胞ではアンドロゲンによって⁴⁷⁾、マウスの肝細胞では核内タンパクである PPAR γ によって⁴⁸⁾、また、頭頸部の扁平上皮癌の細胞株では microRNA-143 によって HKII 発現が調整されているとある⁴⁹⁾。乳癌細胞においても HKII 発現は HIF-1 α 以外の因子に依存している可能性がある。また、今回 HIF-1 α の誘導遺伝子として検討した VEGF は HIF-1 α と相関していたが、MDR-1 は相関関係になかった。これは HIF-1 α 誘導遺伝子の中でも HIF-1 α の調節を大きく受けるものとそうではないものがあり、他の因子により影響を受けるものが混在することを意味すると考えられる。また、誘導遺伝

子間の相関関係も見られなかったことから、HIF-1 α に誘導される遺伝子の発現はそれぞれ独立しており、互いの深い関与はない可能性が示唆される。

本研究でHKIIの過剰発現は乳癌において、予後不良因子であることが明らかになった。HKIIが原発乳癌において予後不良因子であるという報告は調べうる限り初めてである。また、補助療法として内分泌療法を施行した患者群においてもOSでは有意差には至らなかったが、DFSでは有意差を認めた。更に、術後化学療法した患者群においては、OSでは統計学的有意差には至らなかったが、傾向が認められた。これは初発乳癌の予後が比較的良好であることによると考えられる。2004年次の日本乳癌学会登録症例7233例の5年生存率は90.5%、ステージ別の5年生存率ではステージIでは96.6%、ステージIIでは90.9%、ステージIIIでは72.5%、ステージIVでは42.7%である。サブタイプ別の解析はないが、ホルモン受容体陽性群では更に予後良好であると考えられる。今回検討した症例ではステージI,II症例が多く(84%)、平均観察期間が短く(中央値57カ月)、ホルモン受容体陽性(79%)である術後補助内分泌療法を施行した症例(77%)ではOSで統計学的有意差に至らなかったと考えられる。また、術後補助化学療法を施行した群(46%)では平均観察期間が短いことに加え、症例数が少なく、化学療法の修飾が加わっていることなどからOSで有意差がなかったと考えられる。今後は更に観察期間を延長し検討することが望まれる。多変量解析においては、Ki-67 LIとHKIIは独立した再発予測因子であった。胃癌^{16) 40)}や肝癌^{17) 41)}においてもHKIIの高発現は予後不良因子として報告があり、乳癌においては脳転移

巢での検討であるが、脳転移巢の 77% で HKII が高発現しており、予後不良因子として報告している⁵⁰⁾。これらは本研究と一致した見解である。また、HKII 高発現が薬剤抵抗性となる原因については *in vitro* の報告がある。すなわち、HKII は水溶性タンパクで通常は細胞質に存在するが、HK 活性が高い癌細胞では、その N 末端の領域でミトコンドリア外膜の電位依存性アニオンチャネル (voltage dependent anion channel : VDAC) に結合してミトコンドリアで合成された ATP を効率よく利用することによって糖代謝活性の亢進に関与している⁵¹⁾。更に VDAC に結合することによってシトクロム c などのアポトーシス制御分子の細胞質への漏出を抑制することによってアポトーシスを制御していることを報告した⁵²⁾。また本研究でもその発現を検討したが、薬剤耐性に中心的な役割を演じている薬剤排出トランスポーター (ATP-binding cassette transporter, 遺伝名: *ABCB1*) は ATP 依存性であるため HKII が解糖系を亢進させ ATP を産生することによって薬剤排出トランスポーターも活性化され、薬剤抵抗性となると考えられる。MDR-1 は狭義の薬剤排出トランスポーターである。

Nakano らは *ABCB1* 高発現の骨髄腫細胞株を用いて、HKII inhibitor について報告している。すなわち乳酸アナログである 3-BrPA (3-bromopyruvate) は HKII のミトコンドリアへの結合を抑制することによって薬剤排出トランスポーター活性を抑制し、細胞内の薬剤停滞率が増加することを報告している⁵³⁾。内分泌療法耐性に関しては、Farabegoli らが昨年、MCF-Tam (タモキシフェン耐性株) が高い解糖系亢進を示していたことを報告した⁵⁴⁾。

以上より、HKII が高発現することによって、アポトーシスの制御、薬剤抵抗性の獲得、高い細胞増殖能などにより悪性度が高く、術後補助療法を加えても再発する可能性が高いものと考えられる。今後は長期に渡る経過観察と症例の蓄積が必要であり、更に、増殖能、悪性度が高く現在のところ標的治療がなく治療に難渋することが多いトリプルネガティブ乳癌でも同様の検討が望まれる。

VII. 結論

本研究では HIF-1 α の乳癌における発現意義を解明するため、10 例の浸潤性乳管癌患者のマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現プロファイルデータを用いて、64 の HIF-1 α 誘導遺伝子を文献より抽出して、最も再発と関与する遺伝子を検索した。その結果 *HK2* が再発群で最も発現比が高いことが判明した。更に臨床病理学的、免疫組織化学的に浸潤性乳管癌 118 症例を解析したところ、*HKII* の高発現が高い増殖能、悪性度と相関し、独立した予後予測因子となることが解明された。現在術後の補助療法に化学療法を上乗せする指標として一定の見解を得ていないホルモン受容体陽性乳癌でも同様の結果が得られたことで、*HKII* の発現が治療戦略の一助になり、新たな標的治療のターゲットになる可能性があると考えられた。

VIII. 謝辞

本研究にあたり、病理検査学分野の鈴木 貴教授には多大なるご指導ご助言を賜りました。臨床、病理診断について腫瘍外科学分野の甘利 正和先生、病理検査学分野の高木 清司先生、病理部の渡辺 みか先生、笠島 敦子先生、那覇西クリニックの玉城研太郎先生にご指導していただきました。また、実験技術について病理部の高橋 弥生さんにご指導していただきました。この場をお借りして先生方、皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に本研究の機会を与えてくださった大内憲明教授、石田孝宣准教授および腫瘍外科学分野、先進外科学分野の皆様方のご協力に厚く御礼申し上げます。

IX. 引用文献

- [1] Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, et al. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann. Oncol.* 2011; 22: 1736-47.
- [2] Paik S, Shak S, Tang G, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 2004; 351: 2817-26.
- [3] Tevaarwerk AJ, Gray RJ, Schneider BP, et al. Survival in patients with metastatic recurrent breast cancer after adjuvant chemotherapy: Little evidence of improvement over the past 30 years. *Cancer.* 2012.
- [4] Shannon AM, Bouchier-Hayes DJ, Condrón CM, et al. Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies. *Cancer Treat. Rev.* 2003; 29: 297-307.
- [5] Schindl M, Schoppmann SF, Samonigg H, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is associated with an unfavorable prognosis in lymph node-positive breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 2002; 8: 1831-7.
- [6] Bos R, van der Groep P, Greijer AE, et al. Levels of hypoxia-inducible factor-1alpha independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma. *Cancer.* 2003; 97: 1573-81.

- [7] Carroll VA, Ashcroft M. Targeting the molecular basis for tumour hypoxia. *Expert Rev Mol Med*. 2005; 7: 1-16.
- [8] Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3: 721-32.
- [9] Ban HS, Uto Y, Nakamura H. Hypoxia-inducible factor inhibitors: a survey of recent patented compounds (2004 - 2010). *Expert Opin Ther Pat*. 2011; 21: 131-46.
- [10] Kong D, Park EJ, Stephen AG, et al. Echinomycin, a small-molecule inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding activity. *Cancer Res*. 2005; 65: 9047-55.
- [11] Schilsky RL, Faraggi D, Korzun A, et al. Phase II study of echinomycin in patients with advanced breast cancer: a report of Cancer and Leukemia Group B protocol 8641. *Invest. New Drugs*. 1991; 9: 269-72.
- [12] Beaver JA, Park BH. The BOLERO-2 trial: the addition of everolimus to exemestane in the treatment of postmenopausal hormone receptor-positive advanced breast cancer. *Future Oncol*. 2012; 8: 651-7.
- [13] Kurosumi M. Immunohistochemical assessment of hormone receptor status using a new scoring system (J-Score) in breast cancer. *Breast Cancer*. 2007; 14: 189-93.
- [14] Miki Y, Suzuki T, Kitada K, et al. Expression of the steroid and xenobiotic receptor and its possible target gene, organic anion transporting polypeptide-A, in human breast carcinoma. *Cancer Res*. 2006; 66: 535-42.
- [15] Suzuki S, Takagi K, Miki Y, et al. Nucleobindin 2 in human breast carcinoma as a

potent prognostic factor. *Cancer Sci.* 2012; 103: 136-43.

[16] Rho M, Kim J, Jee CD, et al. Expression of type 2 hexokinase and mitochondria-related genes in gastric carcinoma tissues and cell lines. *Anticancer Res.* 2007; 27: 251-8.

[17] Gong L, Cui Z, Chen P, et al. Reduced survival of patients with hepatocellular carcinoma expressing hexokinase II. *Med Oncol.* 2012; 29: 909-14.

[18] Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25: 118-45.

[19] Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *J. Natl. Cancer Inst.* 2011; 103: 1656-64.

[20] Tamaki K, Ishida T, Tamaki N, et al. Analysis of clinically relevant values of Ki-67 labeling index in Japanese breast cancer patients. *Breast Cancer.* 2012.

[21] Surowiak P, Materna V, Matkowski R, et al. Relationship between the expression of cyclooxygenase 2 and MDR1/P-glycoprotein in invasive breast cancers and their prognostic significance. *Breast Cancer Research.* 2005; 7: R862-R70.

[22] Surowiak P, Murawa D, Materna V, et al. Occurrence of stromal myofibroblasts in the invasive ductal breast cancer tissue is an unfavourable prognostic factor. *Anticancer Res.*

2007; 27: 2917-24.

[23] Generali D, Berruti A, Brizzi MP, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha expression predicts a poor response to primary chemoendocrine therapy and disease-free survival in primary human breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12: 4562-8.

[24] Gruber G, Greiner RH, Hlushchuk R, et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha in high-risk breast cancer: an independent prognostic parameter? *Breast Cancer Res.* 2004; 6: R191-8.

[25] Tamaki K, Sasano H, Maruo Y, et al. Vasohibin-1 as a potential predictor of aggressive behavior of ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer Sci.* 2010; 101: 1051-8.

[26] Schachter PP, Ayesh S, Schneider T, et al. Expression of kinase genes in primary hyperparathyroidism: adenoma versus hyperplastic parathyroid tissue. *Surgery.* 2002; 132: 1094-8; discussion 8-9.

[27] Oh DS, Troester MA, Usary J, et al. Estrogen-regulated genes predict survival in hormone receptor-positive breast cancers. *J. Clin. Oncol.* 2006; 24: 1656-64.

[28] Huang E, Cheng SH, Dressman H, et al. Gene expression predictors of breast cancer outcomes. *Lancet.* 2003; 361: 1590-6.

[29] Naoi Y, Kishi K, Tanei T, et al. Development of 95-gene classifier as a powerful predictor of recurrences in node-negative and ER-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* 2011; 128: 633-41.

- [30] Powe DG, Voss MJ, Habashy HO, et al. Alpha- and beta-adrenergic receptor (AR) protein expression is associated with poor clinical outcome in breast cancer: an immunohistochemical study. *Breast Cancer Res. Treat.* 2011; 130: 457-63.
- [31] Funasaka T, Hogan V, Raz A. Phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor mediates epithelial and mesenchymal phenotype conversions in breast cancer. *Cancer Res.* 2009; 69: 5349-56.
- [32] Chakrabarti J, Turley H, Campo L, et al. The transcription factor DEC1 (stra13, SHARP2) is associated with the hypoxic response and high tumour grade in human breast cancers. *Br. J. Cancer.* 2004; 91: 954-8.
- [33] Liu Y, Miao Y, Wang J, et al. DEC1 is positively associated with the malignant phenotype of invasive breast cancers and negatively correlated with the expression of claudin-1. *Int. J. Mol. Med.* 2013; 31: 855-60.
- [34] Oehler MK, Fischer DC, Orłowska-Volk M, et al. Tissue and plasma expression of the angiogenic peptide adrenomedullin in breast cancer. *Br. J. Cancer.* 2003; 89: 1927-33.
- [35] Zhao Y, Liu H, Riker AI, et al. Emerging metabolic targets in cancer therapy. *Front. Biosci.* 2011; 16: 1844-60.
- [36] Mathupala SP, Ko YH, Pedersen PL. Hexokinase II: cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria. *Oncogene.* 2006; 25: 4777-86.

- [37] Mathupala SP, Rempel A, Pedersen PL. Glucose catabolism in cancer cells. Isolation, sequence, and activity of the promoter for type II hexokinase. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 16918-25.
- [38] Brown RS, Goodman TM, Zasadny KR, et al. Expression of hexokinase II and Glut-1 in untreated human breast cancer. *Nucl. Med. Biol.* 2002; 29: 443-53.
- [39] Smith TA. Mammalian hexokinases and their abnormal expression in cancer. *Br. J. Biomed. Sci.* 2000; 57: 170-8.
- [40] Qiu MZ, Han B, Luo HY, et al. Expressions of hypoxia-inducible factor-1 alpha and hexokinase-II in gastric adenocarcinoma: the impact on prognosis and correlation to clinicopathologic features. *Tumour Biol.* 2011; 32: 159-66.
- [41] Kwee SA, Hernandez B, Chan O, et al. Choline kinase alpha and hexokinase-2 protein expression in hepatocellular carcinoma: association with survival. *PLoS One.* 2012; 7: e46591.
- [42] Gerdes J, Schwab U, Lemke H, et al. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int. J. Cancer.* 1983; 31: 13-20.
- [43] Lopez-Lazaro M. The warburg effect: why and how do cancer cells activate glycolysis in the presence of oxygen? *Anticancer Agents Med Chem.* 2008; 8: 305-12.
- [44] Pedersen PL. Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular

- events underlying one of cancers' most common phenotypes, the "Warburg Effect", i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2007; 39: 211-22.
- [45] Srinivas V, Leshchinsky I, Sang N, et al. Oxygen sensing and HIF-1 activation does not require an active mitochondrial respiratory chain electron-transfer pathway. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 21995-8.
- [46] Yasuda S, Arii S, Mori A, et al. Hexokinase II and VEGF expression in liver tumors: correlation with hypoxia-inducible factor 1 alpha and its significance. *J. Hepatol.* 2004; 40: 117-23.
- [47] Moon JS, Jin WJ, Kwak JH, et al. Androgen stimulates glycolysis for de novo lipid synthesis by increasing the activities of hexokinase 2 and 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 2 in prostate cancer cells. *Biochem. J.* 2011; 433: 225-33.
- [48] Panasyuk G, Espeillac C, Chauvin C, et al. PPARgamma contributes to PKM2 and HK2 expression in fatty liver. *Nat Commun.* 2012; 3: 672.
- [49] Fang R, Xiao T, Fang Z, et al. MicroRNA-143 (miR-143) regulates cancer glycolysis via targeting hexokinase 2 gene. *J. Biol. Chem.* 2012; 287: 23227-35.
- [50] Palmieri D, Fitzgerald D, Shreeve SM, et al. Analyses of resected human brain metastases of breast cancer reveal the association between up-regulation of hexokinase 2 and poor prognosis. *Mol Cancer Res.* 2009; 7: 1438-45.

- [51] Pastorino JG, Hoek JB. Hexokinase II: the integration of energy metabolism and control of apoptosis. *Curr. Med. Chem.* 2003; 10: 1535-51.
- [52] Pastorino JG, Shulga N, Hoek JB. Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 7610-8.
- [53] Nakano A, Tsuji D, Miki H, et al. Glycolysis inhibition inactivates ABC transporters to restore drug sensitivity in malignant cells. *PLoS One.* 2011; 6: e27222.
- [54] Farabegoli F, Vettraino M, Manerba M, et al. Galloflavin, a new lactate dehydrogenase inhibitor, induces the death of human breast cancer cells with different glycolytic attitude by affecting distinct signaling pathways. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2012; 47: 729-38.

X. 図の説明

図 1. HIF-1 α の多彩な機能調整

癌組織の低酸素状態により細胞質に蓄積した HIF-1 α は核内に移行し HIF-1 β と 2 量体を形成する。更に標的遺伝子 (hypoxia responsive elements) に結合することにより血管新生、赤血球産生、アポトーシス制御、細胞増殖、解糖系亢進、pH 調節、薬剤抵抗性など様々な増殖因子の転写を誘導する。今回検討するのは血管新生に関与する vascular endothelial growth factor: VEGF、解糖系に関与する hexokinase II: HKII、薬剤抵抗性に関与する multidrug resistance protein 1: MDR-1 である。更に血管新生を反映する微小血管密度 microvessel density: MVD も検討した。

斜字記載は遺伝子名である。

図 2. HIF-1 α 誘導遺伝子

HIF-1 α によって直接誘導される遺伝子は 60 以上報告されている。マイクロアレイのデータ解析には文献 (Semanza GL. Nature reviews Cancer. 2003; 3:721-32) で報告されている HIF-1 α 誘導遺伝子を 64 遺伝子と *HIF-1A* を使用した。

図 3. 65 遺伝子発現比の散布図

64 の HIF-1 α 誘導遺伝子と *HIF-1A* のマイクロアレイ解析による遺伝子の発現量の比

をプロットした散布図である。A では再発群（5 例）、無再発群（5 例）に分け、それぞれの遺伝子発現量の平均値を算出しその比を遺伝子発現比とした。発現比（再発群／非再発群） >1.5 は再発グループで優勢であるとし赤領域で記載、 <0.5 は非再発グループで優勢であるとし青領域で記載した。B は Ki-67 LI を中央値より低値群（7-22%）、Ki-67 LI 中央値より高値群（23-44%）に分け、遺伝子の発現量の比を同様に算出した。発現比（Ki-67 高値群／低値群） >1.5 は Ki-67 高値グループで優勢であるとし赤領域で記載、 <0.5 は Ki-67 低値グループで優勢であるとし青領域で記載した。A で最も発現比が高かったのは 1.9 倍の HK2 であり、B では 1.64 倍であった。

図 4. 免疫組織化学染色

すべて 200 倍検鏡による画像であり、スケールバーは 50 μ m である。

図 5. HKII 発現に関する生存曲線

log-lank 検定によるカプランマイヤー生存曲線である。

A,C,D は無病生存率を示し、B,D,F は全生存率を示す。A,B は乳癌全体の検討、C,D は術後内分泌療法施行症例での検討、E,F は術後化学療法施症例での検討である。

$P < 0.05$ を統計学的有意とし太字で表示、 $0.05 \leq P < 0.1$ を斜字体で表示した。

乳癌症例 118 例では HKII の発現は DFS、OS とともに有意差があった。術後内分泌療法施行症例では DFS で有意差があった。術後化学療法症例では OS で傾向を認めた。

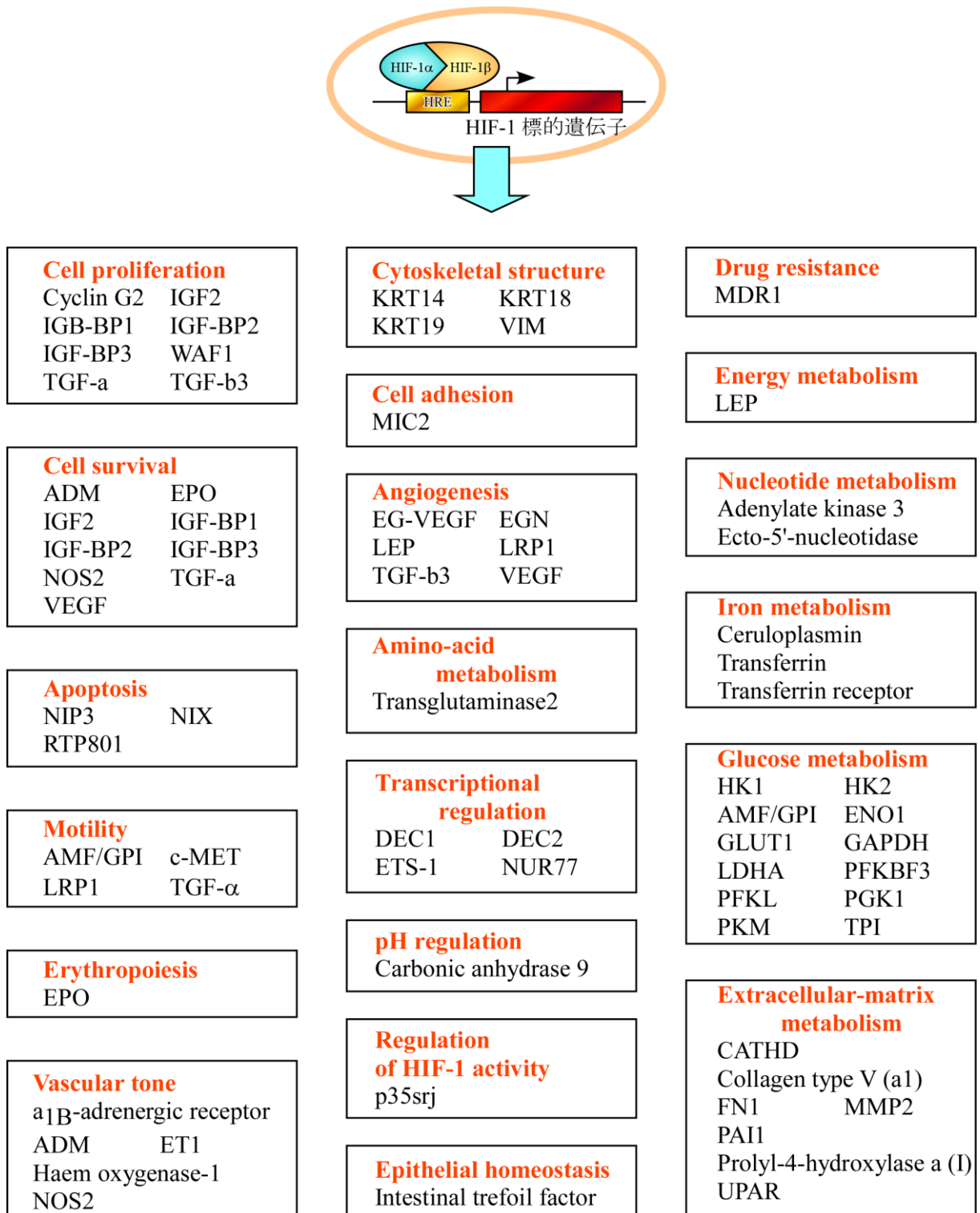
図 7. HKII と解糖系

HKII は解糖系の第一段階を触媒する律速酵素である。多くの癌細胞ではミトコンドリアの酸化的リン酸化反応による呼吸を抑制し酸素消費を抑え、解糖系を亢進させてエネルギー（ATP）を産生している。更には解糖系によって細胞増殖に必要不可欠な生体高分子（ヌクレオチド、アミノ酸、脂肪酸）を多量に作り出しており、これは Warburg 効果とよばれる癌細胞の特徴の一つである。

図 1. HIF-1 α の多彩な機能調整



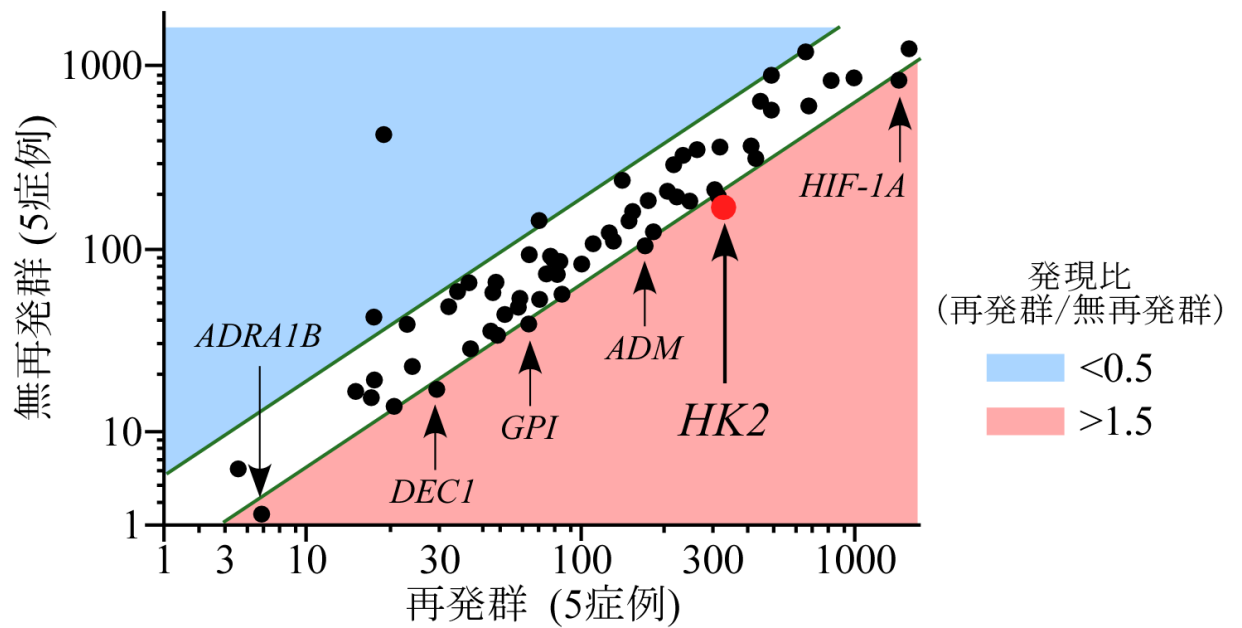
図 2. HIF-1 α 誘導遺伝子



(Semanza GL. Nature reviews Cancer. 2003; 3:721-32 改変)

図 3. 65 遺伝子発現比の散布図

A



B

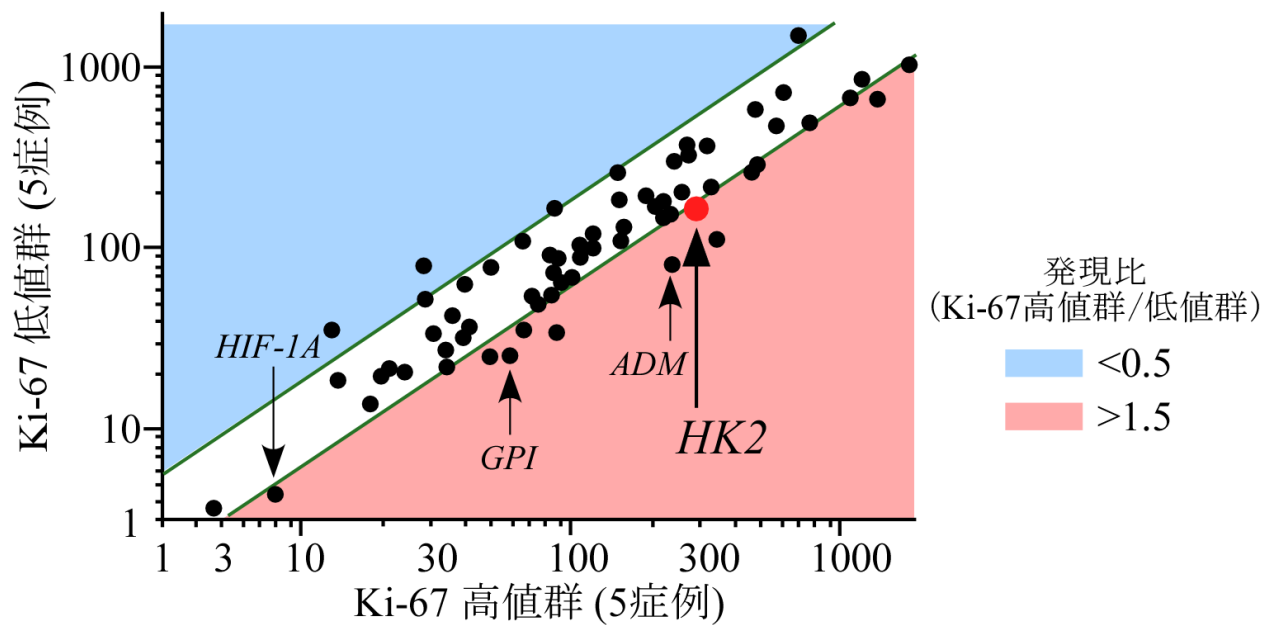
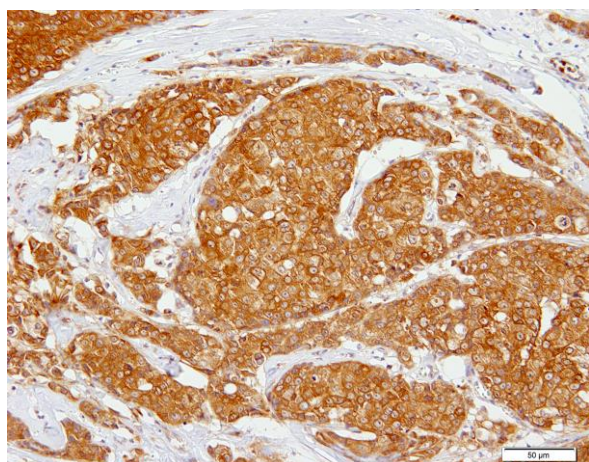
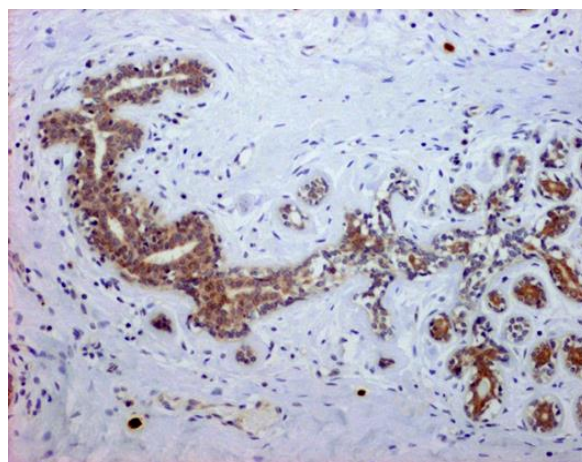


図 4. 免疫組織化学染色

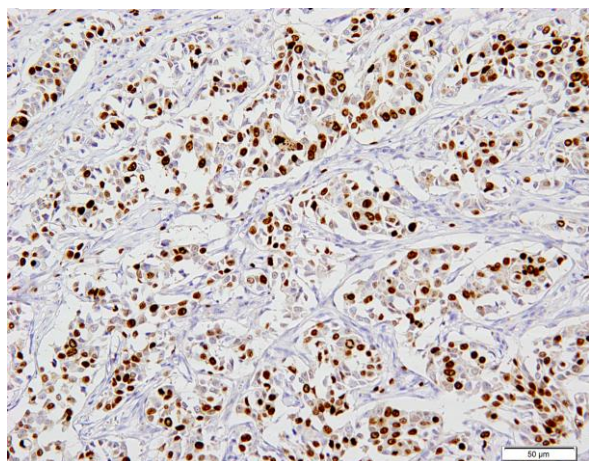
HKII (癌組織)



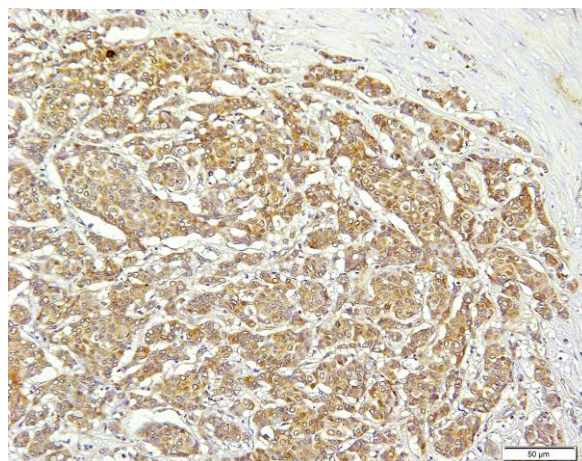
HKII (正常乳腺組織)



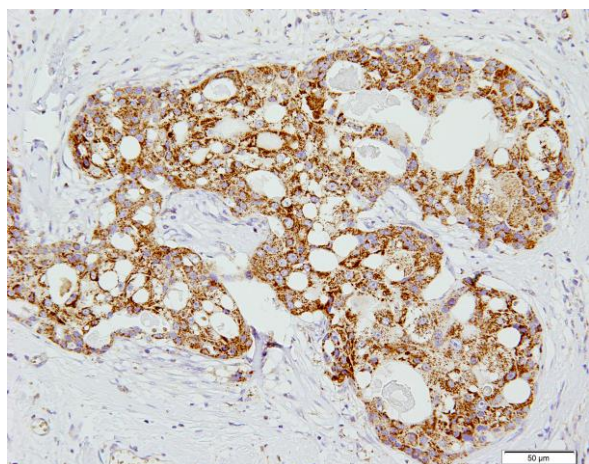
Ki-67



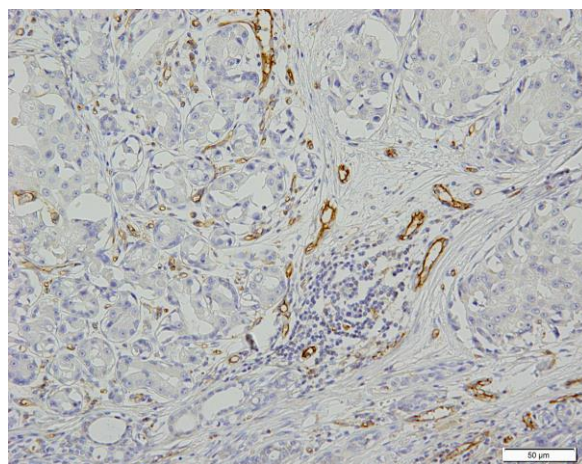
HIF-1 α



VEGF



CD31(microvessel density)



MDR-1

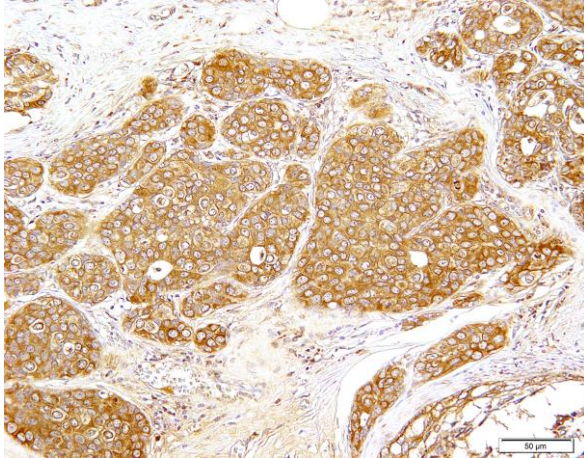


図5. HKII 発現に関する生存曲線

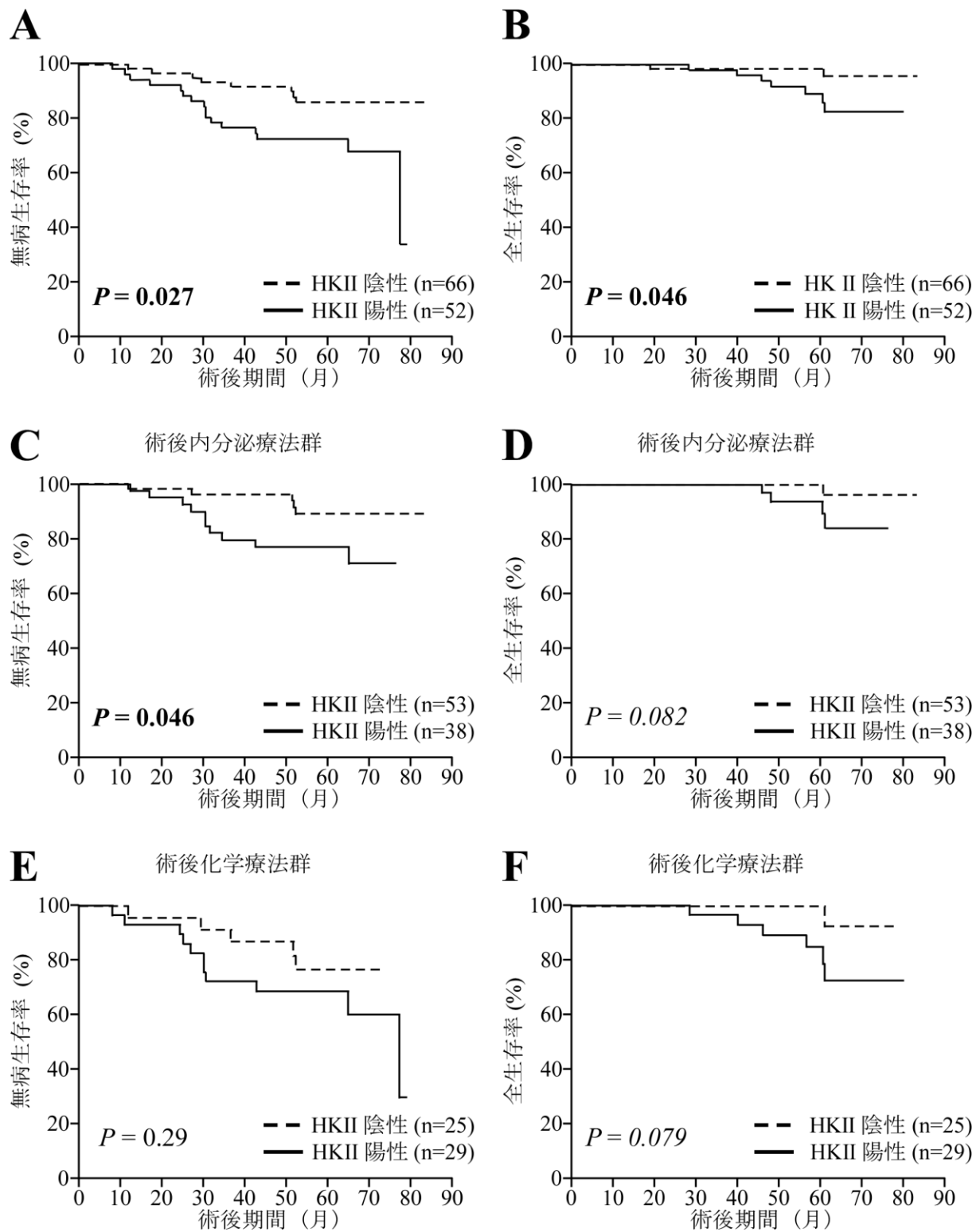
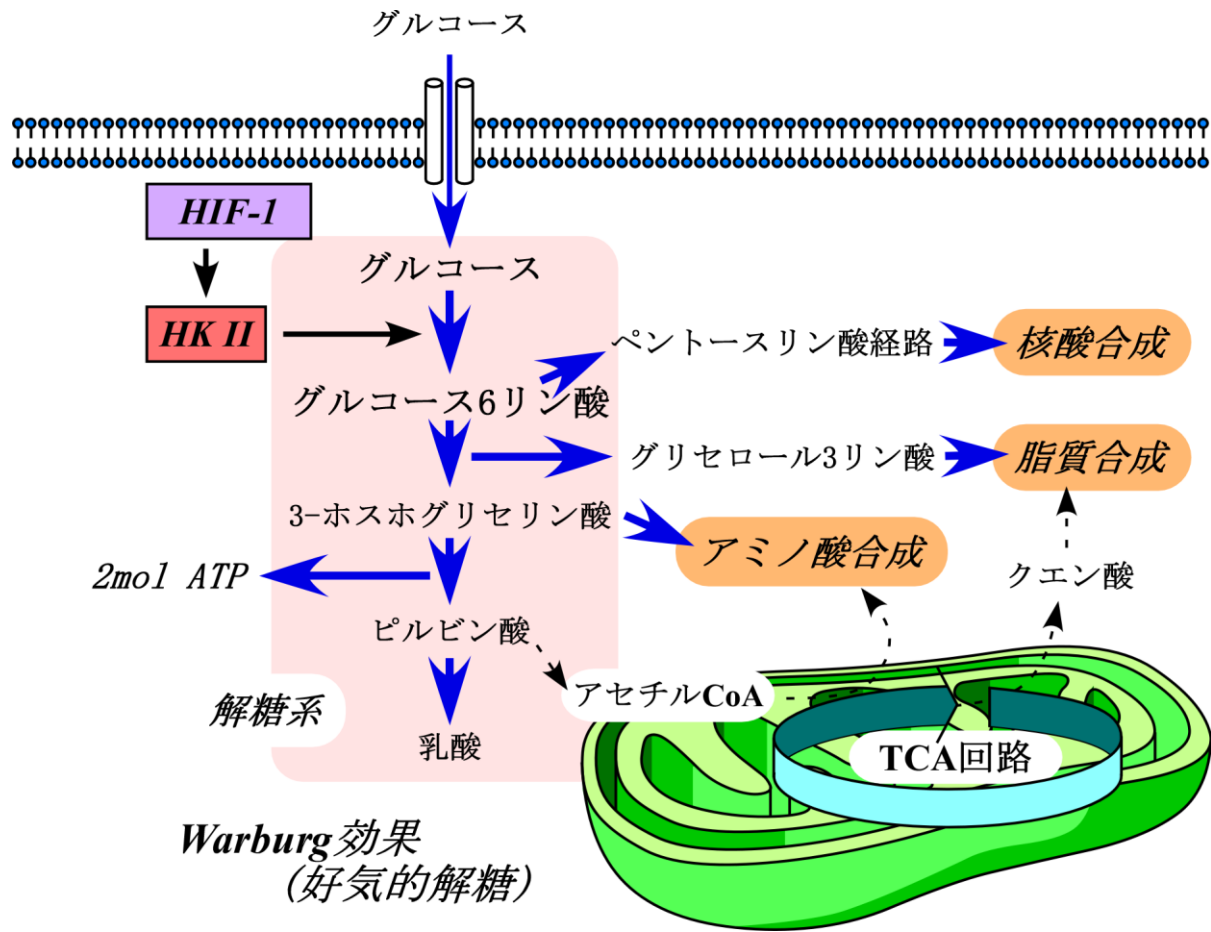


図6. HKII と解糖系



(Majeed et al., J Cancer Sci Ther 2012, 4.9 改変)

XII. 表

表 1. 患者背景

A

対象 1	n=10
年齢 中央値（範囲）	55（48-74）
ER/PgR status	
ER+ and/or PgR+	10
ER- and/or PgR-	0
pStage	
I	1
II	6
III	3
Ki-67LI 中央値（範囲）	23.5（7-44%）
術後補助療法	
術後内分泌療法	10
術後化学療法	4

B

対象 2	n=118
年齢 中央値（範囲）	57（27-87）
サブタイプ	
ER+ and/or PgR+	93（79%）
HER2 positive	17（15%）
Triple negative（ER-PgR-HER2-）	16（13%）
pStage	
I	68（57%）
II	31（7%）
III	19（16%）
pT	
pT1	79（67%）
pT2-4	39（33%）

pN	
陽性	37 (31%)
陰性	81 (69%)
核グレード	
1	66 (56%)
2	24 (20%)
3	28 (24%)
組織学的グレード	
1	46 (39%)
2	46 (39%)
3	26 (22%)
術後補助療法	
術後内分泌療法	91 (77%)
術後化学療法	54 (46%)

表 2. 一次抗体

抗体	クローン	抗体入手先	希釈倍率	抗原賦活
Ki-67	MIB-1	Dako	1:300	AC(pH6)
HKII	C64G5	Cell Signaling Inc.	1:100	AC(pH6)
HIF-1 α	C19	Santa Cruz Biotechnology Inc.	1:100	none
VEGF	JH121	Thermo Scintific	1:100	MW
MDR-1	JSB-1	Abcam	1:40	AC(pH9)
CD31	JC70A	Dako	1:40	AC(pH6)

AC: オートクレーブ in 0.01M クエン酸緩衝液 buffer (pH6.0 or pH9.0), 121°C, 5 分

MW: マイクロウェーブ in 0.01M クエン酸緩衝液 buffer (pH6.0), 95°C, 15 分

HKII: hexokinaseII、HIF-1 α : hypoxia-inducible factor 1 α 、MDR-1: multidrug resistance protein 1、VEGF: vascular endothelial growth factor

表 3. 65 遺伝子の発現比

遺伝子名	Common name	発現比 (再発／無再発)	発現比 (Ki-67高値／低値)
HK2(HKII)	NM_000189	1.90	1.64
ADRA1B	NM_000679	1.83	1.62
DEC1	NM_002160	1.64	1.42
HIF1A(HIF-1α)	NM_001530	1.58	1.38
GPI	NM_000175	1.55	2.18
ADM	NM_001124	1.52	2.75
LEP	NM_000230	1.46	0.94
BNIP3	NM_004052	1.46	0.93
TFRC	NM_003234	1.43	2.84
PGK1	NM_000291	1.43	2.42
CP	NM_000096	1.38	1.83
IGFBP3	NM_000598	1.37	1.39
ABCB1(MDR1)	NM_000927	1.32	1.56
VEGFA(VEGF)	NM_003376	1.29	1.57
NT5E	NM_002526	1.29	1.74
KDR	NM_002253	1.27	1.42
P4HA1	NM_000917	1.26	1.14
LDHA	NM_005566	1.18	1.56
PLAUR	NM_002659	1.16	1.15
SLC2A3	NM_006931	1.15	1.19
DDIT4L	NM_145244	1.14	1.10
CCNG2	NM_004354	1.11	1.37
CDKN1A	NM_000389	1.11	1.29
PFKFB3	NM_004566	1.09	1.58
BNIP3L	NM_004331	1.09	1.42
AK3	NM_016282	1.09	1.13
IGFBP2	NM_000597	1.06	1.16
ALDOA	NM_000034	1.05	0.75
IGFBP1	NM_000596	1.04	0.90
CD99	NM_002414	1.04	1.41
CA9	NM_001216	1.03	1.36
COL5A1	NM_000093	1.00	1.06
IGF2	NM_000612	0.99	1.10
PFKL	NM_002626	0.99	0.91
EDN1	NM_001955	0.98	1.10
MET	NM_000245	0.96	1.11
GAPDH	NM_002046	0.93	1.48
TGFB3	NM_003239	0.93	1.16
FN1	NM_002026	0.92	1.70
ALDH1A	NM_005165	0.91	0.75
MMP2	NM_004530	0.89	1.38
ENG	NM_000118	0.87	0.93
TGFA	NM_003236	0.87	0.85
TF	NM_001063	0.86	0.68

EPO	NM_000799	0.85	1.23
CITED2	NM_006079	0.84	1.27
NR4A1	NM_002135	0.83	0.93
HK1	NM_000188	0.80	0.67
TPI1	NM_000365	0.79	1.12
PROK1	NM_032414	0.70	0.60
ENO1	NM_001428	0.70	0.80
SLC2A1	NM_006516	0.69	0.72
VIM	NM_003380	0.66	0.78
KRT19	NM_002276	0.66	0.76
HMOX1	NM_002133	0.64	0.55
NOS2	NM_000625	0.63	0.50
LRP1	NM_002332	0.58	0.78
ETS1	NM_005238	0.56	0.84
PKM	NM_002654	0.56	1.05
BHLHE41	NM_030762	0.55	0.54
KRT18	NM_000224	0.51	0.43
TFF3	NM_003226	0.50	0.77
CTSD	NM_001909	0.48	0.49
SERPINE1	NM_000602	0.40	0.35
KRT14	NM_000526	0.04	0.33

遺伝子名の太字記載は免疫組織化学染色施行した遺伝子であり、() 記載は発現タンパク名である。

発現比が 1.5 倍以上を太字表示、0.5 倍以下を斜字表示した。

表 4. HKII 発現と臨床病理学的因子の関係

臨床病理学的因子	HKII status		P 値
	陽性(n=52)(%)	陰性(n=66)(%)	
年齢*	55.9 ± 11.4	57.4 ± 13.6	0.56 ^a
閉経状況			
閉経前	18 (15%)	25 (21%)	0.71 ^b
閉経後	34 (29%)	41 (35%)	
pStage			
I	25(21%)	43 (36%)	0.10 ^b
II	15 (13%)	16 (14%)	
III	12 (10%)	7 (6%)	
pT			
pT1	30(25%)	49 (42%)	0.058 ^b
pT2-4	22(19%)	17 (14%)	
pN			
陽性	19(16%)	18 (15%)	0.28 ^b
陰性	33(28%)	48 (41%)	
核グレード			
1	21 (18%)	45 (38%)	0.0099^b
2	14(12%)	10(8%)	
3	17 (14%)	11(9%)	
組織学的グレード			
1	19(16%)	27 (23%)	0.038^b
2	16(14%)	30 (25%)	
3	17 (14%)	9 (8%)	
ER			
陽性	38 (32%)	55 (47%)	0.18 ^b
陰性	14 (12%)	11 (9%)	
PR			
陽性	32(27%)	49(42%)	0.14 ^b
陰性	20(17%)	17(14%)	
HER2			
陽性	7(6%)	10 (8%)	0.79 ^b
陰性	45(38%)	56(47%)	
Ki-67 LI* (%)	19.2 ± 2.0	12.5 ± 1.4	0.0084^a
HIF-1α			
陽性	33(28%)	29(25%)	0.034^b
陰性	19(16%)	37(31%)	
VEGF			
陽性	26(22%)	40(34%)	0.25 ^b
陰性	26(22%)	26(22%)	
MVD*	28.5±2.5	31.4±2.7	0.55 ^a
MDR-1			
陽性	12(10%)	24(20%)	0.12 ^b
陰性	40(34%)	42(36%)	

* ; 平均±標準偏差、^aKruskal-Wallis 検定、^bPearson の χ^2 検定

$P < 0.05$ を統計学的有意とし、太字で表示した。 $0.05 \leq P < 0.1$ は斜字体で表示した。

MVD: microvessel density

表 5. HIF-1 α 関連遺伝子間の相関関係

	HIF-1 α	VEGF	MVD	MDR-1
HKII	0.034	0.250	0.47	0.12
HIF-1 α		0.019	0.17	0.44
VEGF			0.0002	0.25
MVD				0.96

表は 2 群間の相関関係（Pearson の χ^2 検定）であり、表中の数字は P 値を示した。

$P < 0.05$ を統計学的有意とし、太字表示した。

表 6. 乳癌症例（118 例）の単多変量解析

A 無病生存率（DFS）

変数	単変量解析		多変量解析
	<i>P</i> 値	<i>P</i> 値	相対危険度(95% CI)
Ki-67 LI* (60%-1%)	0.0001	0.016	1.05(1.01-1.09)
pT (pT2-4/ pT1)	0.0002	0.053	
pN (陽性/陰性)	0.0027	0.28	
組織学的グレード(3/1,2)	0.0094	0.15	
MVD *(106-3)	0.021	0.17	
HKII (陽性/陰性)	0.027	0.040	2.52(1.04-6.58)
ホルモン受容体 (陰性/陽性)	0.082		
VEGF (陽性/陰性)	0.087		
MDR-1 (陽性/陰性)	0.14		
閉経状況(閉経前/閉経後)	0.21		
HER2 (陰性/陽性)	0.25		
HIF-1 α (陽性/陰性)	0.72		
年齢* (27-87 歳)	0.84		

B 全生存率（OS）

変数	単変量解析		多変量解析
	<i>P</i> 値	<i>P</i> 値	相対危険度(95% CI)
Ki-67 LI* (60%-1%)	0.0018	0.34	
pT (pT2-4/ pT1)	0.0039	0.33	
pN (陽性/ 陰性)	0.0041	0.12	
組織学的グレード (3/1,2)	0.0063	0.95	
HKII (陽性/陰性)	0.042	0.12	
MVD* (106-3)	0.042	0.29	
MDR-1 (陽性/陰性)	0.058		
ホルモン受容体 (陰性/陽性)	0.11		
VEGF (陽性/陰性)	0.23		
閉経状況 (閉経前/閉経後)	0.32		
HIF-1 α (陽性/陰性)	0.54		
年齢* (27-87 歳)	0.55		
HER2 (陰性/陽性)	0.66		

* ; 連続変数で評価した。その他の因子は 2 群間で評価した。単変量、多変量解析ともに COX の比例ハザードモデルを用いた。

表 7. ホルモン受容体陽性症例（93 例）の単多変量解析

A 無病生存率（DFS）

変数	単変量解析		多変量解析
	<i>P</i> 値	<i>P</i> 値	相対危険度(95% CI)
Ki-67 LI* (60%-1%)	0.0003	0.032	1.06(1.00-1.12)
組織学的グレード(3/1,2)	0.0085	0.46	
pT (pT2-4/ pT1)	0.0040	0.10	
MVD *(3-106)	0.023	0.050	
pN (陽性/陰性)	0.027	0.52	
HKII (陽性/陰性)	0.040	0.040	3.08(1.05-10.2)
年齢* (27-87 歳)	0.20		
MDR-1 (陽性/陰性)	0.23		
VEGF (陽性/陰性)	0.60		
HER2 (陰性/陽性)	0.60		
HIF-1 α (陽性/陰性)	0.67		
閉経状況(閉経前/閉経後)	0.87		

B 全生存率（OS）

変数	単変量解析		多変量解析
	<i>P</i> 値	<i>P</i> 値	相対危険度(95% CI)
組織学的グレード(3/1,2)	0.0006	0.19	
MDR-1 (陽性/陰性)	0.0032	0.10	
MVD* (3-106)	0.0040	0.054	
pN (陽性/ 陰性)	0.023	0.15	
HKII (陽性/陰性)	0.074		
pT (pT2-4/ pT1)	0.12		
VEGF (陽性/陰性)	0.33		
年齢* (27-87 歳)	0.51		
HER2 (陰性/陽性)	0.58		
閉経状況 (閉経前/閉経後)	0.86		
HIF-1 α (陽性/陰性)	0.96		

* ; 連続変数で評価した。その他の因子は 2 群間で評価した。単変量、多変量解析ともに COX の比例ハザードモデルを用いた。